

烃的选择性跨膜传输*

刘 晔^{1,2} 牟伯中^{1**} 刘洪来¹

(华东理工大学化学系 上海 200237)¹ (武汉工业学院化学与环境工程系 武汉 430023)²

摘要:研究了烃的跨膜传输过程以及该过程的选择性对细菌降解偏好性的影响。以乳化烷烃实施跨膜传输试验,发现在 18h 内细胞中的烃含量持续增加。对于各单组分烃,跨膜传输效率没有很大差异;但是,在混合烃的竞争性传输试验中,膜表现出显著的选择性。以分离度衡量膜对 4 种链长不等烷烃的选择性,发现十六烷,十七烷,二十烷和二十一烷的分离系数分别为 1.468, 1.121, 0.886 和 0.466,该选择性次序与菌株 1.766 对混合烃的降解次序相符,说明烃的跨膜传输是决定菌株底物偏好性的重要因素。

关键词: 烃降解菌, 跨膜传输, 选择性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0063-05

Selective Transport of Alkanes into Cells of Alkane-degrading Bacteria*

LIU Ye^{1,2} MU Bo-Zhong^{1**} LIU Hong-Lai¹

(Department of Chemistry, ECUST, Shanghai 200237)¹

(Department of Chemical and Environmental Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023)²

Abstract: The process of alkanes transport into cells and the effect of transport selectivity on priority of different alkanes in biodegradation were studied. An alkane transport experiment based on emulsion of alkanes shows that the inclusive alkanes in cells increase steadily in 18 hours during incubation with alkanes. The transport efficiency for each of the specific alkanes does not show remarkable difference, while for mixtures of alkanes, a significant selectivity exists in the competitive transport experiment. The Selective factor of hexadecane, heptadecane, eicosane and heneicosane are 1.468, 1.121, 0.886 and 0.466, respectively, in which the order is consistent with the degradation order of each component degraded by *P. marginata* 1766. It suggests that the transport of alkanes into the cell is an important factor governing the priority of various alkanes in biodegradation.

Key words: Alkane-degrading bacterium, Transport of alkane, Selectivity

烃的微生物降解过程可分为以下几个主要阶段,(1) 烃在水相中的传递;(2) 烃与细胞的有效接触;(3) 烃的跨膜传输;(4) 烃的细胞内氧化降解。其中前面 3 阶段构成了烃的微生物摄取过程^[1],经该过程细胞中积累了大量内含烃,这些烃成为烃氧化系统的底物^[2]。烃的微生物摄取过程一直受到关注,人们往往通过微生物生长动力学和底物降解动力学来间接推测其机制^[3,4]。但是,以这些手段观察到的通常是上述各阶段共同作用的结果,因此只能得到笼统的认识。

已经证实烃是以原始的分子形态被输送到细胞中的^[2];而且,还发现烃的跨膜传输是需要能量的主动运输过程^[5]。而对于其具体机制,目前知之甚少。最近的一些研

* 国家自然科学基金资助 (No. 50374038)

教育部博士点基金 (No. 20030251002)

教育部重点项目 (No. 03071)

** 通讯作者 Tel: 021-64252063, E-mail: bzmu@ecust.edu.cn

收稿日期: 2005-06-21, 修回日期: 2005-08-09

究表明, 烃的跨膜传输过程具有选择性, 该现象预示了细胞膜上的主动运输系统在分离工程中所具有的应用潜力^[6]。本文将烃的跨膜传输从整个降解过程中独立出来, 对该过程的选择性进行了定量的分析, 从而证实烃跨膜传输对烃的微生物降解效率和偏好性产生重要影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

菌株 *P. marginata* 1766 选自中国微生物保藏中心, 经 LB 液体培养基培养复壮, 培养试验证实该菌为一株长链烷烃降解菌。十二烷到三十烷购自 Aldrich Chemical Company, Inc. (USA) 或天津化学试剂研究所, 纯度大于 97%。

1.2 烷烃降解试验

在以 0.1% 烃碳源培养 7d 的发酵液^[8]中加入 6 mol/L HCl, 使 pH 值调至 2, 以庚烷萃取残余烷烃 3 次, 合并后加入氯代十六烷内标再定容。经气相色谱测定残留烷烃的组成与含量并计算降解率。

1.3 烷烃跨膜传输试验

12,000g 离心 10min 收集以十八烷培养的细胞, 以乙醇/正丁醇/氯仿 (10:10:1) 混和液洗涤 2 次, 去除细胞表面附着的烃。将细胞重悬于无碳源的新鲜盐培养基中继续培养, 以制备饥饿细胞。离心收集饥饿细胞后, 再以基本盐培养基洗涤 3 次, 细胞重悬于该培养基中制得饥饿细胞悬液。-50℃ 下冷冻干燥恒重测定单位体积悬液细胞干重。

1% (V/V) 烷烃加入含 100 mg/L 聚乙烯醇 1750 的无 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐培养基中, 以 400W 超声波分散 5min 制备烃乳化液。在该乳化中定量加入上述饥饿细胞悬液, 30℃ 下振荡混合以使细胞摄取烃。

1.4 内含烃的收集

12,000g 离心 10min 使烃乳化液破乳, 并收集细胞。以混和溶剂洗涤 3 次, 再以 5 mol/L NaOH 在室温下浸泡细胞 12 h, 使细胞裂解^[6]。调节裂解液至 pH 2, 氯仿/甲醇 (2:1) 3 次萃取细胞内含烃, 烃含量经气相色谱定量。

1.5 透射电镜分析

离心收集细胞, 洗涤后以 2.5% 的戊二醛固定 1h, 再以 1% 锇酸固定 12h, 洗涤后脱水, 以 618* 环氧树脂包埋。超薄切片后采用 PHILIPS CM-120 透射电镜观察并拍照。

2 结果与讨论

2.1 菌株对烷烃的降解偏好性

天然石油产品中不同链长的烷烃含量不是均匀分布。因此, 配制了 C_{16} 到 C_{30} 的等比混合烃作为碳源, 以考察菌株 1.766 对底物的偏好性。培养 7d 后, 各组分的降解率如图 1。

图 1 表明, 菌株 1.766 能够降解测试范围内所有的组分, 但优先降解碳链较短的组分。在混合烃降解试验中往往见到类似的现象, 无论是单一的烃降解菌, 还是一组烃降解菌, 都表现为优先降解碳链较短的烃组分^[7]。虽然这种现象多有报道, 但对其原因的讨论较少。

2.2 饥饿细胞的制备

用于烃跨膜传输试验的细胞应该具有以下特征, (1) 细胞结构完整并具有正常的生理活性; (2) 细胞已经启动并表达了与烃摄取及氧化相关基因; (3) 细胞中的内含烃含量没有达到饱和, 也就是细胞能够继续摄取外源烃, 即饥饿细胞。通过监测菌浓变化考察了饥饿细胞的制备条件, 结果如图 2 所示。

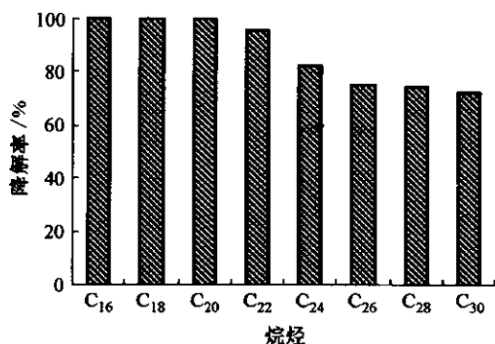


图 1 菌株 1.766 对混合烃的降解

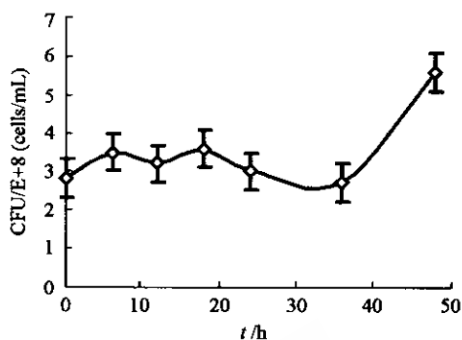


图 2 活菌浓度的变化曲线

图 2 表明, 在不添加碳源的情况下, 20h 内菌浓没有显著变化, 随后活菌数开始下降; 30h 时添加了十八烷, 随后菌浓迅速上升。这就是说, 在前 20h 内细胞能够利用胞内储备的内含烃维持正常的生理活动, 随后出现营养缺乏; 在重新获得外源烃后, 细胞的生长又恢复了。采用透射电镜观察细胞内含体, 如图 3 所示。

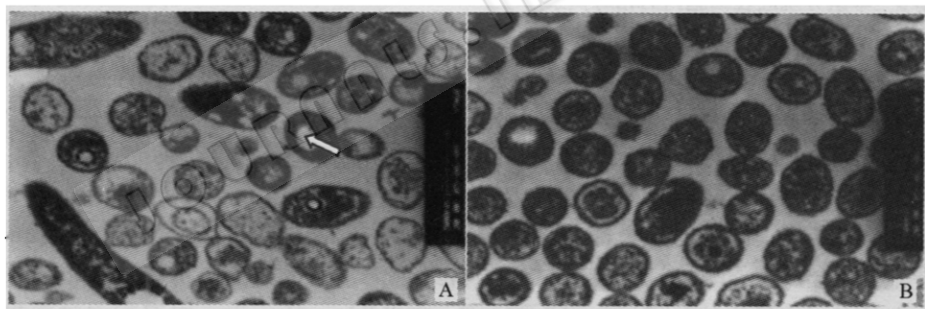


图 3 细胞的透射电镜图像 (20,000 ×)

A 烃碳源培养的细, B 20h 收集的饥饿细胞

图 3A 中的细胞为烃碳源培养的细胞, 多数含有大小不一的内含体 (如箭头所示), Beal 等证实这些内含体就是烃的聚集物^[2]; 而图 3B 中为 20h 收集的饥饿细胞, 内含体显著减少。根据以上试验结果可以确认, 大部分内含烃在 20h 内消耗, 而此时细胞仍然保持正常的生理活性, 因此适合用于烃跨膜传输试验。

2.3 烃在细胞内的积累过程

本研究采用的烃跨膜传输试验基于以下考虑。首先, 为细胞提供充分分散的乳化烃, 以消除界面面积对烃摄取的影响^[8]; 其次, 采用高分子非离子型乳化剂稳定乳化体系, 以减少表面活性剂对细胞表面疏水性以及电荷性质的影响^[9]。为细胞提供乳化 C₁₅, 在设定时间检测细胞中 C₁₅ 的积累量, 结果如图 4。

Naoyuki 等以菲为底物的跨膜传输试验中, 发现在几分钟内细胞持续不断地摄取菲, 并在高浓度下达到饱和^[9]。在 Kim 等的研究中, 在分析内含烃之前细胞与未乳化

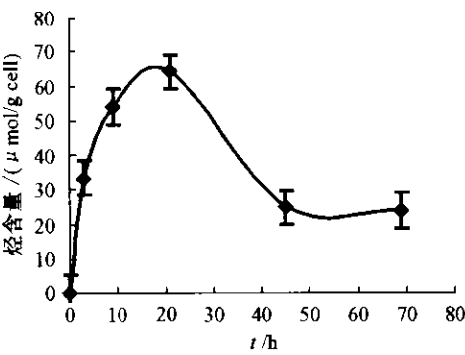


图4 十五烷在细胞内的积累

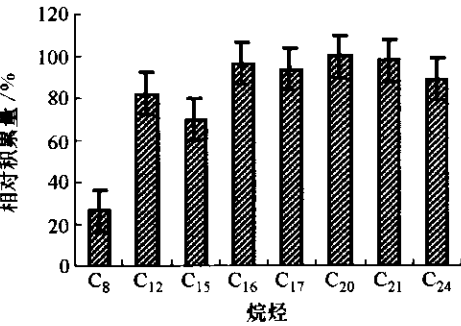


图5 单组分烷烃在细胞内的相对积累量

到C₂₄烷)的 *alkB2* 基因在 *P. putida* GPo1 的突变株中表达,发现新的工程菌能够利用C₁₄烷,而其亲本 GPo1 只能利用C₆到C₁₂的烷烃^[10]。图5还表明,对于菌株1.766降解范围内的烷烃,烃的跨膜传输效率差别不大。

2.5 跨膜传输的选择性

为了解烃跨膜传输的选择性,将烃的跨膜传输过程视为一个分离系统,以不同组成的烷烃混合物为外源烃,经传输试验分析细胞内含烃的组成,分析两者的差异。在此以分离度α表征膜的选择性,组分Cx的α定义为:

$$\alpha = \frac{[X_{Cx}/X_{alk}]_{accum}}{[X_{Cx}/X_{alk}]_{added}}$$

以不同比例的烷烃混和物实施跨膜传输试验,结果如图6,分析结果见表1。

表1 跨膜传输对各种烷烃的选择性

烷烃	α (斜率 k)	相关系数
C ₁₆	1.468	0.9993
C ₁₇	1.121	0.9961
C ₂₀	0.886	0.9965
C ₂₁	0.466	0.9653

图6显示,各组分在细胞内外的分配保持了良好的线形关系(参见表1线性相关系数),也就是说膜的选择性对于其中任一组分是确定的。Kim等在考察 *Rhodococcus erythropolis* 膜对十六烷和姥鲛烷的选择性时发现,随着外源烃中十六烷含量的下降,膜对这两种异构体的选择性是不断提高的^[6]。而在本实验中,膜对同系物也有选择性,

烃的接触持续了3到5d^[6]。而在本试验体系中,C₁₅的含量在9h内持续高速上升,然后烃的积累逐渐减速,在18h时达到饱和。然而,随着时间的延长内含烃的量减少,应该是高浓度的细胞在长期无法获得必要生长因子(氮源)而发生自溶所致。

2.4 单组分烃的跨膜传输

烃在细胞内的积累应该是两个过程共同作用的结果。其一是烃经由主动运输系统从细胞外运移至细胞内,其二是细胞内烃的氧化消耗。正是由于烃的跨膜传输速度远高于烃的消耗速度,因此在外源烃充分供应的时候细胞能积累大量内含烃。为了比较各种单组分烃的跨膜传输能力,分别考察了各组分9h后在细胞中的积累量,结果如图5。

可以看出,菌株1.766虽不能以C₈为碳源生长,然而在细胞中仍然有少量积累,说明烃的主动运输系统的底物范围比氧化系统的底物范围更宽。Smits等的试验中发现了同样的现象,他们将 *P. aeruginosa* PAO1(可降解C₁₂

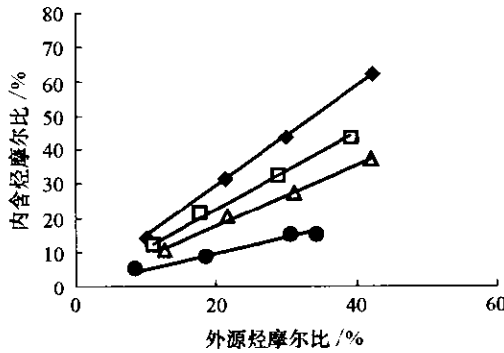


图 6 混合烃各组分在细胞内外的含量

—●— 表示 C₁₆, —□— 表示 C₁₇, —△— 表示 C₂₀, —●— 表示 C₂₁

但该选择性并没有因组分含量的变化而发生变化。各曲线的斜率即为分离度 α , 结果列于表 1。

由表 1 可知, 膜对混合物中各组分的分离度随碳链长度增加依次降低。该结果证实烃经过跨膜传输时组成将发生变化, 使烃氧化酶的底物组成与细胞外不同, 从而对烃的降解次序产生影响。此外, 虽然在单组分烃的传输试验中, 我们并没有发现主动运输系统对各种烃的运移能力有显著差异, 但在混合烃的竞争性传输试验中, 膜的选择性显著。而且, 该选择性的次序与细胞对底物降解的偏好性相符, 说明烃的选择性跨膜传输是影响烃选择性降解的重要因素。

在本研究中, 观察到细胞膜对烃的同系物具有良好的识别和分离能力。对该分离机制深入的了解, 对开发新的生物分离系统有指导意义。

3 结论

(1) 以乳化烃体系考察烃的跨膜传输过程, 发现在 9h 以内烃在细胞中迅速积累, 到 18h 时达到饱和。(2) 在实验菌株降解范围内各单组分的跨膜传输效率没有显著差异, 而且细胞能够积累本身不能氧化的辛烷。(3) 在混合烃传输试验中, 观察到烃的选择性跨膜传输作用, C₁₆、C₁₇、C₂₀ 和 C₂₁ 烷的跨膜传输分离度分别为 1.468、1.121、0.886 和 0.466。这种选择性次序与菌株 1.766 对混合烷烃的降解次序相符, 说明烃的跨膜传输过程对烃降解菌的底物偏好性产生重要影响。

参考文献

- [1] 刘 晔, 牟伯中, 刘洪来. 微生物学通报, 2005, 32 (2): 115 ~ 119.
- [2] Beal R, Betts W B. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89: 158 ~ 168.
- [3] Hori K, Matsuzaki Y, Tanji Y, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 574 ~ 579.
- [4] Dong H C, Katsutoshi H, Yasunori T, et al. Biochemical Engineering Journal, 1999, 3: 71 ~ 78.
- [5] Miyata N, Iwahori K, Foght J M, et al. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70 (1): 363 ~ 367.
- [6] Kim I S, Foght J M, Gray M R. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 80 (6): 650 ~ 659.
- [7] Kazunari S, Yoshio S, Kazuhiro M, et al. Environmental Microbiology, 2003, 5 (6), 517 ~ 522.
- [8] 刘 晔, 傅 涛, 牟伯中, 等. 微生物学通报, 2005, 32 (3): 1 ~ 6.
- [9] Bruheim P, Bredholt H, Eimhjellen K. Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (4): 1658 ~ 1661.
- [10] Smits H M, Stefanie B B, Bernard W, et al. Journal of Bacteriology, 2002, 184 (6): 1733 ~ 1742.